

图 2 酯酶同工酶酶谱

Fig. 2 Zymograms of esterase isozymes

菌株的遗传背景及双亲株的关系。从酶谱中发现,融合株的同工酶谱中存在双亲株的特征性酶带并有新的酶带产生,说明融合菌株同时具有来自双亲株的基因组,而且融合过程中双亲株的基因发生重组,引起同工酶基因间的抑制表达发生变化或有新酶基因的产生。

2.3 融合重组子分析:茯苓菌种采用灭活原生质体融合技术可以获得理想的杂交新菌株。双亲灭活原生质体融合的特点是可以省去遗传标记菌株的筛选,还有利于排除双方亲本类型的再生菌株,便于选择融合重组子<sup>[7]</sup>。原生质体灭活主要包括 3 种不同的方式:热灭活、紫外线灭活以及化学灭活。热灭活是目前采用最广泛的手段。但热灭活必须配合其他灭活方式,温度对双亲菌株原生质体作用位点在不同细胞中差异很小,灭活后致死损伤部位基本相同,不能做到互补融合,而得不到融合子再生菌株。双亲

原生质体均用紫外线灭活处理。大剂量的 UV 处理在不同位点上损伤 DNA,因而有可能使融合子的某些代谢途径受到干扰,最终影响生产中产量,但紫外线灭活法的优点是可以刺激双亲菌株基因组间的交换。因此,在试验过程中,Z<sub>10-2</sub>选用原生质体热灭活,Z<sub>10-3</sub>选用原生质体紫外线灭活,融合后双亲原生质体损伤部位得到互补,就很容易从再生平板上挑选出融合子再生菌株。

利用该方法笔者已选出融合子再生菌株,并通过形态学、亲和性、酯酶同工酶分析,确定该再生菌株为双亲融合子;该菌株是否为优质高产菌株,还有待于进一步生产中试验结果来证明。

References:

[1] Liu Z T, Luo X C. *The Biotechnology and Appliance of Edible Mushroom* (食用真菌生物技术及应用) [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2002.  
 [2] Xin M X, Ma Y E. The protoplast fusion and appliance of microorganism [J]. *Bull Microbiol* (微生物学通报), 1995, 22(6): 365-370.  
 [3] Zhou D P, Ping W X. *The Protoplast Fusion of Microorganism* (微生物原生质体融合) [M]. Harbin: Heilongjiang Scientific and Technical Press, 1990.  
 [4] Liang Q L, Wang Q Y, Zeng N K, et al. Separation and regeneration of *Poria cocos* protoplast [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 773-775.  
 [5] He J C, He Y X. Study on the breeding of *Pleurotus ostreatus* by inactivated protoplast fusion [J]. *Edib Fungi* (食用菌), 1999, 6: 10-11.  
 [6] He Z X, Zhang S Z. *Electrophoresis* (电泳) [M]. Beijing: Science Press, 1999.  
 [7] Chang S T, Lin F C. *The Heredity and Breeding of Mushrooms* (真菌遗传与育种) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1997.

不同部位、不同产地南五味子中木脂素类成分的比较

徐丽华<sup>1,2</sup>, 梁春霞<sup>3</sup>, 孙 萌<sup>2</sup>, 李桂凤<sup>3</sup>, 余伯阳<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009; 2. 苏州大学药学院, 江苏 215007; 3. 苏州市思源医药科技有限公司, 江苏 苏州 215011)

南五味子为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实。性味酸、甘、温, 归肺、心、肾经, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效。用于久嗽虚喘、津伤口渴、短气脉虚、心悸失眠等症<sup>[1]</sup>。南五味子主要分布于华中、西南等地, 其化学成分主要有挥发油、木脂素、三萜、多糖、有机酸等<sup>[2-5]</sup>。木脂素类成分是南五味子的主

要活性部位<sup>[6,7]</sup>, 其中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲具有降酶保肝活性, 五味子乙素、醇甲具有安神作用, 本实验采用 HPLC 法检测了南五味子果肉、种皮、种仁中五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲的量, 并用紫外-可见分光光度法检测了总木脂素的量, 同时检测了 5 个不同产地南五味子中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的量。检测结果显示, 检测部位

收稿日期: 2006-01-13

作者简介: 徐丽华(1968—), 中国药科大学博士研究生, 苏州大学药学院讲师, 主要从事中药和天然药物研究。

\* 通讯作者 余伯阳 E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

不同,所含成分的量不同。利用多项指标检测,可反映不同产地南五味子内在质量。

## 1 仪器与试剂

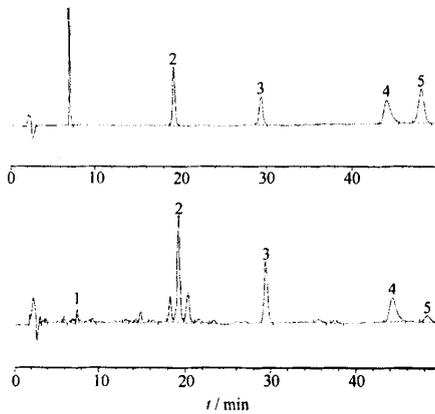
日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,SPD-10Avp 紫外可见检测器;N2000 色谱工作站;岛津 UV-1240 紫外可见分光光度计;Mettler Toledo 十万分之一电子天平。

五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲对照品均购于中国药品生物制品检定所,甲醇为色谱纯,水为超纯水,南五味子药材购于安徽亳州药材市场。经南京中医药大学吴启南教授鉴定为南五味子。

## 2 方法与结果

### 2.1 南五味子中五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件及系统适用性:色谱柱:Nucleosil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水 (90:10);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 °C;检测波长:254 nm。色谱图见图 1。



1-五味子醇甲 2-五味子酯甲 3-五味子甲素  
4-南五味子素 5-五味子乙素  
1-schizandrol A 2-wuweizi ester A 3-schiandrin A  
4-kadsurin 5-schizandrin B

图 1 对照品混合溶液(A)和药材样品(B)HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference mixture (A) and crud drug sample (B)

2.1.2 对照品溶液制备:分别精密称取五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲对照品各 5.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成 0.20 mg/mL 对照品混合溶液。

2.1.3 供试品溶液制备:精密称取南五味子药材粉末(过 60 目筛)2.0 g,置 250 mL 烧瓶中,精密加入 100 mL 甲醇,称定质量,回流提取 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液

为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察:精密吸取五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲对照品混合溶液 0.2 mg/mL 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、20.0 μL,分别进样测定,记录色谱图,测定峰面积;以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,五味子甲素、乙素、酯甲和醇甲的回归方程分别为: $Y=1\ 435\ 931 X-134\ 521$ , $r=0.999\ 9$ ; $Y=552\ 352 X+23\ 887$ , $r=0.999\ 3$ ; $Y=702\ 875 X-21\ 825$ , $r=0.999\ 9$ ; $Y=1\ 149\ 773 X-21\ 802$ , $r=0.999\ 8$ 。结果表明,五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲在 0.2~4.0 μg 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验:精密吸取五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲对照品混合溶液 5 μL,按 2.1.1 项色谱条件进行分析,连续进样 5 次,计算各成分峰面积的 RSD 分别为 0.72%、1.12%、0.55%、1.05%。结果表明精密度良好。

2.1.6 重现性试验:取同一批样品 5 份按 2.1.3 项方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项色谱条件,分别精密吸取 5 μL 进样,外标法计算出 5 份供试品中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲的量,算出各成分 RSD 分别为 1.36%、1.73%、0.97%、1.28%。结果表明该方法重现性良好。

2.1.7 稳定性试验:取同一供试品溶液分别于 0、1、2、4、8 h 依上述色谱条件进样 5 μL,测得峰面积,计算各成分的 RSD 分别为 1.63%、1.24%、1.38%、1.55%。结果表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.1.8 回收率试验:取上述已测定量的同一批样品 6 份,每份精密称定 1.0 g,分别依次加入五味子甲素对照品 4.0、4.0、4.8、4.8、5.6、5.6 mg,五味子乙素对照品 1.0、1.0、1.5、1.5、2.0、2.0 mg,五味子酯甲对照品 11.0、11.0、13.0、13.0、14.0、14.0 mg,五味子醇甲对照品 0.5、0.5、1.0、1.0、1.5、1.5 mg,制备加样回收供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率,结果五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲的平均回收率分别为 98.79%、97.65%、100.31%、98.52%;RSD 为 1.73%、1.98%、1.16%、1.57%。

### 2.2 紫外可见分光光度法测定南五味子中总木脂素

2.2.1 对照品溶液制备:精密称取五味子甲素 4.0 mg,至 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成含五味子甲素 0.04 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备:精密称取南五味子药材粉末(过 60 目筛)2.0 g,置 250 mL 烧瓶中,精密加入 100 mL 甲醇,称定质量,回流提取 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液

0.5 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度即为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察:精密称取五味子甲素 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成含五味子甲素 0.1 mg/mL 的对照品溶液,取该液分别以甲醇稀释至 0.04、0.03、0.02、0.01、0.004 mg/mL 溶液,在 280 nm 下测吸光度值,以对照品质量浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标,标准曲线为: $Y=41.21932X-0.04652$ , $r=0.9992$ 。结果表明,五味子甲素对照品溶液在 0.04~0.004 mg/mL 呈良好线性关系。

2.2.4 精密度试验:按 2.2.2 项制备供试品溶液,取供试品溶液在 280 nm 下连续测定 5 次,以吸光度值计算 RSD 为 1.04%。结果表明精密度良好。

2.2.5 重现性试验:取同一批样品 5 份,按 2.2.2 项制备供试品溶液,在 280 nm 下测定吸光值,以吸光度值计算 RSD 为 1.74%。结果表明重现性良好。

2.2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液分别于 0、1、2、4、8 h 在 280 nm 处测定吸光度值,以 0.04 mg/

mL 五味子甲素对照品混合溶液为对照,计算木脂素的量,并计算 RSD 为 1.45%。结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.7 回收率试验:取已测定量的同一批样品 1.0 g 各 6 份,精密称定,分别依次加入五味子甲素对照品 4.0、4.0、4.8、5.6、5.6 mg,按 2.2.2 项制备加样回收供试品溶液,在 280 nm 处测定吸光度值,计算回收率。结果平均回收率为 97.79%,RSD 为 1.78%。

### 2.3 样品测定

2.3.1 南五味子不同部位五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的测定:精密称取南五味子果肉、种皮、种仁粉末(过 60 目筛)各 2.0 g,分别依供试品溶液的制备处理,照上述条件测定南五味子不同部位五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的量,结果见表 1。

2.3.2 不同产地南五味子中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的测定:分别精密称取 5 个产地的南五味子及吉林产北五味子粉末(过 60 目筛)2.0 g,制备供试品溶液,分别依上述条件测定五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的量,结果见表 2。

表 1 南五味子不同部位中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of schiandrin A, schiandrin B, Wuweizi ester A, schizandrol A, and total lignans in different parts of *Fructus Schisandrae Sphenantherae* (n=3)

部位	五味子甲素/%	五味子乙素/%	五味子酯甲/%	五味子醇甲/%	总木脂素/%
果肉	0.43	0.02	0.56	未检出	1.98
种皮	0.44	0.03	0.79	0.06	4.10
种仁	1.34	0.06	2.09	0.16	10.71

表 2 不同产地南五味子中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of schiandrin A, schiandrin B, Wuweizi ester A, schizandrol A, and total lignans in *Fructus Schisandrae Sphenantherae* from different habitats (n=3)

品种	产地	经纬度	五味酯甲/%	五味子甲素/%	五味子乙素/%	五味子醇甲/%	4 个活性成分总量/%	总木脂/%
北五味子	吉林	43.58	0.17	0.11	0.32	0.55	0.75	未检
南五味子	河北安国	38.40	0.85	0.50	0.20	0.11	1.66	5.83
	安徽亳州	33.74	1.05	0.39	0.27	0.08	1.79	5.29
	河南沈丘	33.31	1.33	0.68	0.18	0.08	2.27	5.12
	陕西安康	32.69	1.20	0.47	0.15	0.07	1.83	5.20
	河南信阳	32.19	1.27	0.51	0.13	0.07	1.98	4.54

### 3 讨论

由实验结果可看出,南五味子不同部位中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的量差异很大,种仁中所测木脂素类成分及总木脂素的量都远高于果肉和种皮中的量,特别是五味子醇甲在果肉中未检测到,说明南五味子中木脂素类活性成分主要集中于种仁中。传统五味子入药均捣碎入煎,除有利于有效成分煎出外,可能五味子的果肉、种皮、种仁中木脂素成分的量

也不尽相同。本实验验证了五味子传统用法的科学性,为五味子捣碎入煎提供了合理依据。

由 5 个产地南五味子和北五味子样品的测定结果可看出,5 个产地的南五味子中总木脂素的量相近,但 5 个产地的南五味子中木脂素类成分组成有差异,其中河南、陕西产南五味子中五味子甲素、酯甲的量稍高,而五味子乙素、醇甲的量却稍低,这个差异也正是南北五味子的差异;在地域上,安徽、河

北两个产地纬度比陕西、河南两个产地高,由此推测南北的气候差异可能与南五味子木脂素类成分的量有关,关于这个差异形成的实际原因和 5 个产地的南五味子其他成分差异还有待进一步研究。

#### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
 [2] Yang F, Yuan J, Fu P. The Research survey of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. [J]. *West China J Pharm Sciraia* (华西药理学杂志), 2003, 18(6): 438-440.  
 [3] Yang X L, Li A M. The Research survey of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*

- (时珍国医国药), 1999, 10(4): 300-301.  
 [4] Zhou Y, Yang J S, Wang L W, et al. The triterpenoids components in *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(2): 81-83.  
 [5] Ji Y H, Sun Y, Zhang X B, et al. The collect rate of polysaccharides and the determination of polysaccharides content in south Wuweizi [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10(11): 810.  
 [6] Bao T T, Xu G F, Liu G T, et al. A comparison of the pharmacological actions of seven constituents isolated from *Fructus Schizandrae* [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1979, 14(1): 1-7.  
 [7] Zhang L K, Niu X Y. Effects of schizandrol A on monoamine neurotransmitters in the central nervous system [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 1991, 13(1): 13-16.

## RP-HPLC 法测定藏药龙胆花的两种原植物 白花龙胆和蓝玉簪龙胆中龙胆苦苷

刘 圆, 孟庆艳, 彭镰心, 刘 超, 尚远宏

(西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041)

龙胆花为藏医常用品种,分为白花龙胆和杂花龙胆,在临床上为多品种入药,具有清湿热、泻肝胆实火、镇咳、利喉、健胃功能,主治感冒发烧、目赤咽痛、肺热咳嗽、胃热、脑痧、尿道热、阴痒及阴部湿疹、天花等。白花龙胆为龙胆科植物高山龙胆 *Gentiana purdomii* Marq. 的花,收载于《四部医典》。《蓝琉璃》云:“邦见按花色不同可分为白色、蓝色和杂色三类,白色为上品。”西藏稀有上品白花龙胆,主要以杂花龙胆入药,就其品种而言为蓝玉簪龙胆或云雾龙胆<sup>[1]</sup>。

杂花龙胆为龙胆科植物蓝玉簪龙胆 *G. veitchiorum* Hemsl. 和云雾龙胆 *G. nubigena* Edgew. 的花。龙胆科植物主要含有的裂环烯醚萜苷类化学成分龙胆苦苷(gentiopicroside)、当药苷(sweroside)、当药苦苷(swertiamarin),是龙胆科的苦味成分和活性成分<sup>[2]</sup>。藏医认为白花龙胆为上品,本实验拟对藏药龙胆花的两种原植物白花龙胆和蓝玉簪龙胆中龙胆苦苷的量进行比较,为龙胆花多品种入药提供更科学的依据。

### 1 仪器与材料

Waters2695/2690 分离系统,2996(2487)检测器,Empower 色谱管理系统。甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂为分析纯。龙胆苦苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(110770-200308,定量测定用)。白花龙胆和蓝玉簪龙胆均购于西藏拉萨市药

材市场,现二者分别作为三味龙胆胶囊和十味龙胆花胶囊的原料药之一使用,经笔者鉴定白花龙胆为龙胆科植物高山龙胆 *G. purdomii* Marq. 的花,蓝玉簪龙胆为龙胆科植物蓝玉簪龙胆 *G. veitchiorum* Hemsl. 的花。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件:用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);甲醇-3%磷酸(30:70)为流动相;检测波长为 274 nm;柱温:30 °C,体积流量:1 mL/min。在此色谱条件下,龙胆苦苷与样品中的其他组分峰达到基线分离,峰形较好。按龙胆苦苷峰计算,色谱柱的理论塔板数不低于 3 000。其余谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取龙胆苦苷对照品适量,加甲醇溶解制成 0.102 0 mg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:精密量取白花龙胆和蓝玉簪龙胆粉末(60 目)各约 0.3 g,于 25 mL 量瓶中,加甲醇 15 mL,超声 45 min,放冷,定容至刻度,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.4 标准曲线的制备:分别按 2.1 项色谱条件,精密进样龙胆苦苷对照品溶液 1、2、3、4、5 μL,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,进行线性回归,得回归方程为  $Y=219\ 597 X-91\ 280$ ,  $r=0.999\ 9$ 。龙胆苦苷在 0.102 0~0.510 0 μg 进样量与峰面积线性关系良好。

收稿日期:2006-03-21

基金项目:四川省科技厅应用基础研究项目(2006);四川省教育厅项目(2005);四川省青年基金项目(2007)

作者简介:刘 圆(1968—),女,重庆忠县人,西南民族大学教务处副教授,博士学位,主要从事少数民族药物的研究和教学工作,现在四川大学华西药学院药理学博士后流动站工作。 Tel:(028)85522263 13808091609 E-mail:yuanliu321@126.com